

論文の内容の要旨

氏名 杉田 亮平
指導教員 中西 友子

論文題目

シロイヌナズナにおける放射性同位元素を用いた無機元素動態の可視化技術の開発

1. 背景

植物体内の元素分布は刻一刻と変化するため、生きた植物を用いて元素動態を解析することで、サンプリングが必要な破壊実験では得られなかった新しい知見が見出されることが期待される。植物中の元素動態を非破壊で経時的に撮像するために、本研究では、リアルタイム RI イメージングシステム (RRIS) の高度化に取り組んだ。RRIS による元素の可視化には放射性同位体 (RI) を用いるが、プロトタイプでは可視化できる核種が ^{32}P に限られていた。そこで、多種類の元素動態を解析するために、入手できる、できるだけ多くの核種において解析可能な装置の開発を行った。まず、様々な核種に対する RRIS の定量性を評価した。すなわち、RI 線源および各 RI を吸収させたシロイヌナズナの各組織を用い、定量可能な範囲を組織別に検証した。次に、RRIS の撮像と植物への照明を両立させるためのシステム構築を、さらに放射能像と実画像の同時撮影システムの構築を行った。こうした基本システムの改良の後、シロイヌナズナの体内における様々な核種の輸送動態を可視化し、動態の特徴から元素動態を 3 つのカテゴリーに分けることで、輸送様式のパターンを推察した。さらには、元素の長距離輸送過程における各組織への分配供給メカニズムの解明を目的として、花茎での輸送様式が特徴的であった ^{22}Na 、 ^{28}Mg および ^{45}Ca の維管束から周囲組織への輸送割合を比較した。また、放射性物質の投与と撮像の同時実施が難しい $^{14}\text{CO}_2$ の動態解析にチャレンジすることで、光合成産物の輸送動態への展開例を示した。

2. リアルタイム RI イメージングシステムの定量性評価

RRIS 画像から RI 量の経時変化を解析するためには、定量性の確保が必須である。RI はそれぞれ異なる線質・エネルギーの放射線を異なる割合で放出するため、定量可能な範囲を RI ごとに求める必要があった。そこで、線源を 2 種類 (シート上のスポットおよび RI 吸収させた植物組織) 用意し、3~15 分の積算時間において、各 RI の濃度とともに RRIS 像と Imaging Plate (IP) 像と比較した。核種は入手可能かつ線質の違いを幅広くカバーすることを考えて ^{14}C 、 ^{22}Na 、 ^{28}Mg 、 ^{65}Zn 、 ^{86}Rb 、 ^{109}Cd 、 ^{137}Cs を用いた。解析の結果、RRIS は積算時間の増加に伴って定量上限値/下限値がほとんど変化せず、ダイナミックレンジは 3 桁のオーダーであった。このことは、RRIS によるライブイメージングでは、3 分や 5 分といっ

た短い時間での画像取得において定量性を損なうことなく、物質動態を経時的に解析できることが示された。

続いて、植物試料とシンチレータの空間が定量性に与える影響を評価した。放射線をシンチレータで光に変換した後、その光を撮像する原理上、試料とシンチレータの距離は画像の解像度に影響を及ぼすことから、定量性への影響を調べる必要があった。そこで、線源と FOS (表面にシンチレータを蒸着したプレート) との間に人為的に様々な厚さのスペースを作成し、FOS 表面から試料までの距離と、検出されるシグナル強度の関係を調べた。その結果、線源と FOS が 0.4 mm 離れると、画像上でその線源と同じ面積あたりのシグナル強度は約 3-5 割低下するものの、測定する面積をその線源の面積よりも大きくした場合、シグナル強度は低下しなかった。この結果により、試料と FOS の間の空間が一定しない場合でも、測定面積を試料面積よりも広く設定することで、定量的に解析することが可能であることが示された。

放射線エネルギーは、線源を含む植物体自身の遮蔽によりそのエネルギーが減衰(自己吸収)するため、定量性が低下することが問題となる。そこで、シロイヌナズナを用いて、厚さや構造の異なる各組織別に自己吸収の影響を解析した。その結果、花と葉では全核種で定量的な解析が可能であり、 ^{28}Mg では莢・花茎でも定量可能であった。また、強いエネルギーの放射線を放出する核種ほど定量性が高いわけではなく、例えば、 ^{22}Na や ^{137}Cs と比較して、放出される放射線エネルギーが弱い ^{109}Cd は、高い定量性を示した。 ^{22}Na においては、莢における定量性は花茎に比べて低く、反対に、 ^{137}Cs における定量性は、莢の方が花茎に比べて高かった。このように、放射線の線質や組織内での RI 分布が影響することが示唆された。続いて、植物の模擬として、厚さが均一な遮蔽材(ポリエチレン製ラップ、ポリカーボネート製シート)を用いて、遮蔽が定量性に及ぼす影響を検証した。その結果、遮蔽厚 10-30 μm の時に ^{14}C は 4-7 割減少し、その他の核種においては遮蔽厚 0.2-0.4 mm で、 ^{22}Na ; 7-9 割、 ^{65}Zn ; 6-7 割、 ^{86}Rb ; 4-6 割、 ^{109}Cd ; 6-8 割、 ^{137}Cs ; 6-7 割減少した。 ^{65}Zn が放出する放射線の最大エネルギーは、 ^{22}Na と比較して弱いにも関わらず、遮蔽の影響度合いは小さかったことは、 β 線、X 線などの放射線の線質が、遮蔽への影響が大きいことを示している。そこで、1 つの RI から放出される複数の各放射線に着目し、FOS の検出に対する各放射線の寄与率を線質に分けて検証するため、計算機シミュレーションを用いて検証した。解析の対象として、 ^{14}C 、 ^{22}Na 、 ^{28}Mg 、 ^{65}Zn 、 ^{86}Rb 、 ^{109}Cd 、 ^{137}Cs に加え、 ^{28}Mg の娘核種である ^{28}Al を用いた。解析の結果、 β 線やエネルギーの低い X 線は FOS の検出に対する寄与率が高く、エネルギーの高い γ 線の寄与率は低いことがわかった。次に、花茎における自己吸収の影響をシミュレーションした。シミュレーションは、組織内の元素分布が均一でない場合も考慮し、RI 分布を、維管束にのみ RI が存在する花茎(周辺局在)、中心部に RI が局在する花茎(中心局在)、均一に RI が分布する花茎(均一分布)の 3 パターン想定して行った。解析の結果、 ^{28}Al 、 ^{65}Zn 、 ^{86}Rb 、 ^{109}Cd においては、花茎内における RI 分布の違いが RRIS で検出されるシグナル強度に与える影響は小さかった。これは、 ^{28}Al 、

^{86}Rb は、放出する β 線のエネルギーが高いこと、 ^{65}Zn 、 ^{109}Cd においては放出する X 線の植物組織透過力が高いことが、自己吸収の影響を受けにくい要因であると考えられた。一方、 ^{22}Na 、 ^{137}Cs が放出する γ 線エネルギーはシンチレータへのエネルギー寄与は低く、透過力の弱い β 線を主に検出するため、自己吸収の影響を大きく受けることが示唆された。また、 ^{14}C においては、均一分布と比較して周辺局在分布で得られるシグナル強度は 9 割程度減少し、周辺局在と比較して中心局在ではさらに 9 割程度減少した。均一分布は周辺分布と比較して、周辺分布は中心局在と比較して、より花茎の表面方向に ^{14}C 量が多いため、自己吸収の影響が小さいと考えられた。これらの結果から、エネルギーが高い β 線および X 線は、植物組織による自己吸収の影響度合いは小さい一方で、エネルギーが低い β 線および γ 線は、自己吸収の影響が大きいことが示された。

3. 間欠照明システムの構築による様々な核種における輸送動態の可視化

エネルギー強度が強い β 線や弱い X 線を放出する一部の核種においては、植物と FOS との間に遮光のためにアルミ板を設置することで、植物に光りを当てながら RRIS で撮像することが可能であったものの、多くの核種にその方法は適用不可能である。そこで、照明方法を備えた撮影システムを構築する必要があった。そこで RI 像を撮影する間のみ植物への照明を消し、RI 撮像を断続的に実施することで、撮像以外の時間は照明を施すシステムを構築した。その結果、今回対象とした RI 全てにおいて照明下の植物における輸送動態の可視化が可能となった。さらに、間欠照明における明期に植物試料をデジタルカメラで撮影するシステムを構築し、RRIS による RI 画像と実画像を重ね合わせる撮影手法を構築した。撮影中に伸長する花茎の先端と RI のシグナルの位置の上端が一致しており、根に吸収された ^{32}P -リン酸が、植物の地上部の隅々にまで速やかに輸送される様子が捉えられた。

以上の改良を施した RRIS を用いて、実際に花茎を持つステージのシロイヌナズナにおいて、 ^{22}Na 、 ^{28}Mg 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{45}Ca 、 ^{54}Mn 、 ^{65}Zn 、 ^{109}Cd 、 ^{137}Cs を根から投与することで地上部への蓄積の様子を可視化した。各 RI 画像を比較した結果、地上部における元素の分布様式は、植物全体に分布した ^{22}Na 、 ^{32}P -リン酸、 ^{35}S -硫酸、 ^{137}Cs (均一型)、植物全体に分布し、特に茎生葉や莢において局所的に分布した ^{65}Zn 、 ^{109}Cd (局在型)、葉や茎頂側に比べ花茎の基部側に蓄積した ^{28}Mg 、 ^{45}Ca 、 ^{54}Mn (蓄積型)の 3 つのグループ(均一型、局在型、蓄積型)に分類された。グループ 1 に分類された元素は、一価カチオン、およびアニオン、グループ 2 に分類された亜鉛とカドミウムは共に、有機酸等にキレートされて長距離輸送される元素、グループ 3 には、多価カチオンが分類された。各元素の分布は、元素ごとの積み下ろし・積み込みのメカニズムの違いに由来することから、維管束からの積み下ろしに着目した解析を行った。解析は、花茎の中の特定の部位に流入する放射性核種の量と、この部位よりもさらに上部へ移行する放射性核種の量を算出し、そこから蓄積率を割り出すことを行った。研究対象として、蓄積型である ^{28}Mg と ^{45}Ca 、および均一型である ^{22}Na を

用いた。その結果、花茎での積み下ろし量は、吸収開始後 8.5-24 時間において、 ^{28}Mg 、 ^{45}Ca は直線的に増加したが、 ^{22}Na においては指数的に増加した。このことは、花茎に輸送された ^{22}Na には、ロゼット葉を経由せずに花茎へ直接輸送されたものと、ロゼット葉に入った後に花茎へ輸送されものが存在し、撮影初期には後者がまだ検出されなかったことを表しているのではないかと考えた。 ^{28}Mg と ^{45}Ca は、吸収開始後 8.5-24 時間において、積み下ろし割合の経時変化はなかった。尚、興味深いことに、花茎の位置と積み下ろし割合に高い相関があり、高い位置にある花茎ほど通過量あたりの積み下ろした割合が高く、さらには、節と節間による区別が見られなかった。一方 ^{22}Na は、積み下ろし割合の経時変化は、節間は一定であったが、節においては時間とともに増加した。これは、直接花茎へ輸送された ^{22}Na と、ロゼット葉に入った後に師管により花茎へ輸送された ^{22}Na では、節における積み下ろしのメカニズムが異なることが考えられる。

4. 光合成産物における輸送動態の可視化

これまでの投与方法は全て経根であったが、ここでは、光合成産物の移行解析を視野にいれ、二酸化炭素の投与および光合成産物の動態解析を試みた。まず、特定の組織に ^{14}C を供与する実験系を構築した。続いて、RRIS を用いた ^{14}C -光合成産物の輸送動態の可視化および解析を試みた。可視化および解析は、 $^{14}\text{CO}_2$ をパルス吸収させ、その後を観察するパルス-チェイス実験、および $^{14}\text{CO}_2$ の吸収と RRIS 撮影を同時に行うことで光合成により ^{14}C が固定されていく動態を可視化する連続吸収実験の 2 パターンを行った。その結果、気体状の RI を用いた輸送動態の可視化が可能となり、さらには、根のソースはロゼット葉であり、花茎はソースとしての役割を持たないこと、花茎の茎頂のソースはロゼット葉であり、分枝の茎頂のソースはロゼット葉と茎生葉であることがわかった。このように、特定の組織に $^{14}\text{CO}_2$ を投与することで、シンク・ソース組織の関係を解析できる可能性を見出した。

本研究ではシロイヌナズナにおける無機元素の輸送動態の可視化を目的とし、RRIS を用いた様々な無機元素における輸送動態の可視化技術を開発した。また、可視化した連続画像の解析により、輸送における新たな知見を得ることができた。RRIS は、植物体内での分布を制御するメカニズムを解明するために重要な情報を提供できると期待される。